

**This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

第2583257号

(45) 発行日 平成9年(1997)2月19日

(24) 登録日 平成8年(1996)11月21日

(51) IntCl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	FI	技術表示箇所
C07K 14/605	ZNA	8517-4H	C07K 14/605	ZNA
A61K 38/26	ADP		A61K 37/28	ADP

発明の数2 (全 12 頁)

(21) 出願番号	特願昭62-502896	(73) 特許権者	999999999
(86) (22) 出願日	昭和62年(1987)5月5日		ザ・ジェネラル・ホスピタル・コーポレーション
(65) 公表番号	特表平1-502746		アメリカ合衆国マサチューセッツ02114、
(43) 公表日	平成1年(1989)9月21日		ボストン、フルート・ストリート (パ
(86) 国際出願番号	PCT/US87/01005	(72) 発明者	ハバナー、ジョエル
(87) 国際公開番号	WO87/06941		アメリカ合衆国マサチューセッツ02161、
(87) 国際公開日	昭和62年(1987)11月19日		ニュートン・ハイランズ、プリマス・ロ
(31) 優先権主張番号	859928		ード217番
(32) 優先日	1986年5月5日	(74) 代理人	弁理士 青山 稔 (外2名)
(33) 優先権主張国	米国 (US)		審査官 西川 和子
		(56) 参考文献	Diabetologia, 28, 704 -707 (1985) REGULATORY PEPTID E, 13, P101 (1985)

(54) 【発明の名称】 インシュリン向性ホルモン

1

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】 式:

$\text{NH}_2-\text{X}-\text{CO}-\text{R}^1$

【式中、Xは、式:

$\text{His}-\text{Ala}-\text{Glu}-\text{Gly}-\text{Thr}-\text{Phe}-\text{Thr}-\text{Ser}-\text{Asp}-$   
 $\text{Val}-\text{Ser}-\text{Ser}-\text{Tyr}-\text{Leu}-\text{Glu}-\text{Gly}-\text{Gln}-\text{Ala}-$   
 $\text{Ala}-\text{Lys}-\text{Glu}-\text{Phe}-\text{Ile}-\text{Ala}-\text{Trp}-\text{Leu}-\text{Val}-$   
 $\text{Lys}-\text{Gly}-\text{Arg}-(\text{Gly})_n$

(式中、nは0又は1を表す)

で示される配列を有しインシュリン向性活性を有する、  
実質上、天然の不純物を含有しないペプチドであって、  
Xの両側の $\text{NH}_2$ -及び $\text{CO}-$ の各基は、該ペプチドのア  
ミノ及びカルボキシ末端側に位置するアミノ酸に由来す  
る基を表している。 $\text{R}^1$ はOH、OMまたは $\text{NR}^2\text{R}^3$ であって、  
Mは薬学的に許容し得る陽イオンまたは低級の分枝鎖ま

2

たは非分枝鎖アルキル基、 $\text{R}^2$ および $\text{R}^3$ は水素および低級  
の分枝鎖または非分枝鎖アルキル基からなる群から選択  
される互いに同一または異なる基を表す。)

で示される化合物、その酸付加塩、並びに保護された、  
または部分的に保護されたペプチド化合物。

【請求項2】 nが1である請求項1記載のペプチド化合  
物。

【請求項3】 nが0である請求項1記載のペプチド化合  
物。

【請求項4】  $\text{R}^1$ がOHである請求項1～3のいずれかに記  
載のペプチド化合物。

【請求項5】 式:

$\text{NH}_2-\text{X}-\text{CO}-\text{R}^1$

【式中、Xは、式:

$\text{His}-\text{Ala}-\text{Glu}-\text{Gly}-\text{Thr}-\text{Phe}-\text{Thr}-\text{Ser}-\text{Asp}-$

3

Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-(Gly)。

(式中、nは0又は1を表す)

で示される配列を有しインシュリン向性活性を有する、実質上、天然の不純物を含有しないペプチドであって、Xの両側のNH<sub>2</sub>-及び-CO-の各基は、該ペプチドのアミノ及びカルボキシ末端側に位置するアミノ酸に由来する基を表している。R<sup>1</sup>はOH、OMまたはNR<sup>2</sup>R<sup>3</sup>であって、Mは薬学的に許容し得る陽イオンまたは低級の分枝鎖または非分枝鎖アルキル基、R<sup>2</sup>およびR<sup>3</sup>は水素および低級の分枝鎖または非分枝鎖アルキル基からなる群から選択される互いに同一または異なる基を表す。)

で示される化合物、その酸付加塩、並びに保護された、または部分的に保護されたペプチド化合物の有効量と、インシュリン向性医薬としての使用に適した薬学上許容し得る担体とを含有する膵B型島細胞におけるインシュリンの発現を刺激または促進するための医薬組成物。

【請求項6】糖尿病の治療に用いられるものである請求項5記載の医薬組成物。

【請求項7】nが1である請求項5または6記載の医薬組成物。

【請求項8】nが0である請求項5または6記載の医薬組成物。

【請求項9】R<sup>1</sup>がOHである請求項5～8のいずれかに記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

発明の背景

産業上の利用分野

本発明は、プレホルモン、プログルカゴンのある種のペプチドフラグメントがホルモン様活性を有し、ホルモン、即ちインシュリンの合成および分泌を刺激するのに使用し得るという発見に関するものである。これらのペプチドフラグメントは、糖尿病の治療に有用である。

従来技術と発明が解決すべき課題

膵臓の島(ランゲルハンス島)細胞における内分泌は血液-骨代謝(グルコース、アミノ酸、カテコールアミン等)のみならず、局所のパラクリンの影響等、複雑なコントロール下にある。主な膵島ホルモン(グルカゴン、インシュリンおよびソマトスタチン)は、それらに特異的な細胞型(夫々、A、BおよびD型細胞)の間で相互作用し、代謝物質によって伝達(mediate)される分泌応答を変調(modulate)する。インシュリン分泌は、血中の糖(グルコース)濃度によって優先的にコントロールされているが、グルカゴンおよびソマトスタチンもグルコースによって伝達されるインシュリンの分泌応答を、夫々、刺激および抑制する。既に提案されているインシュリン分泌に対する島内のパラクリン制御以外に、膵内にもインシュリン向性因子が存在することを示す証拠がある。この概念は、経口摂取されたグルコース

4

のインシュリン分泌刺激作用が、同等量の静脈内投与されたグルコースに比べてはるかに強いという観察結果に基づいている。

ヒトホルモン、グルカゴンは、膵A細胞で産生される29アミノ酸のペプチドホルモンである。このホルモンは、セクレチン、胃酸抑制性ペプチド、血管作用性腸ペプチドおよびグリセンチン等、構造上、似通ったペプチドの、マルチ遺伝子ファミリーに属している。これらのペプチドは、炭水化物代謝、胃腸の運動性、および分泌工程等を様々に制御している。しかしながら、膵グルカゴンの基本的な作用として認識されているのは、グリコーゲン分解と糖新生の促進作用であり、その結果としての血中糖濃度上昇作用である。このことに関連し、グルカゴンの作用はインシュリンと反対の制御効果を顕し、糖尿病を伴った高血糖症をもたらすことになる[Diabetes mellitus, ルンドラ(Lund, P. K.) Proc. Natl. Acad. Sci., USA 79-349 (1982)]。

グルカゴンは、インシュリン産生細胞の表面に存在する特異的リセプターと結合し得ることが見出された。これらのリセプターと結合すると、グルカゴンは該細胞を刺激してcAMPの迅速な合成をもたらす。次いで、cAMPが、インシュリン発現を刺激することが見出された[コーマンら(Korman, L. Y.), Diabetes, 34:717-722 (1985)]。インシュリンはグルカゴン合成阻害作用を有する[Review of Medical Physiology, ゲノン(Genon, W. P.), 1979, Lange出版, ロス・アトラス, カリフォルニア, p. 273]。このように、グルカゴンの発現は、インシュリンにより、究極的には血中糖濃度により、注意深く制御されている。

グルカゴンの遺伝子は、まず、630塩基対の前駆体が翻訳されてポリペプチド、プレプログルカゴンとなる(ルンドラ, 1982)。次いで、このポリペプチドがプロセッシングされてプログルカゴンになる。パツェルトら(Patzelt, C.), Nature, 282:260-266 (1979)は、プログルカゴンがグルカゴンと第2のペプチドとに開裂されることを示した。ルンドラ(Lund, P. K.), ロベツら(Lopez, L. C.)およびベルら(Bell, G. I.) (Nature) 302:716-718 (1983)は、リジン-アルギニンジペプチド残基の直ぐ後方でプログルカゴン分子が開裂されることを示した。海峽ナマズ(Ictalurus punctata)によって産生されたプログルカゴンの研究において、この動物のグルカゴンも隣接するアルギニン-リジンジペプチド残基およびアルギニン-アルギニンジペプチド残基の直ぐ後方で開裂されることが示された[アンドリュース(Andrews, P. C.) J. Biol. Chem., 260:3910-3914 (1985)]。ロベツら(Lopez, L. C.) (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:5485-5489 (1983))およびベルら(Bell, G. I.)は、哺乳類のプログルカゴンは、リジン-アルギニンペプチドまたはアルギニン-アルギニンジペプチドの部位で開裂されることが並びに、プログルカゴン分子は

3つの異なった、高度にホモロジーなペプチド分子、即ち、グルカゴン、グルカゴン様タンパク質1 (GLP-1) およびグルカゴン様タンパク質2 (GLP-2) を含有していることを示した。ロベツらは、グルカゴン様タンパク質1は37アミノ酸残基の長さであってグルカゴン様タンパク質2はアミノ酸残基34の長さであると結論した。ラットのプレログルカゴンの構造に関する同様の研究でも、タンパク分解的開裂のパターンについて、隣接するリジン-アルギニンジペプチドか、アルギニン-アルギニンジペプチドの間で開裂され、グルカゴン、GLP-1、およびGLP-2が生成されることが分った【ハインリッヒら (Heinrich, G.), *Enderinol.* 115:2176-2181 (1984)】。ヒト、ラット、ウシおよびハムスターのGLP-1の配列は同一であることが分った【ギグリオンら (Ghiglieri, M.), *Diabetologia*, 27:599-600 (1984)】。

ロベツらのGLP-1の大きさに関する結論はウテンタルら (Uttenthal, L.O.) (*J. Clin. Endocrinol. Metabol.*, 61:472-479 (1985)) によって追認された。ウテンタルらは、ヒト膵臓に存在するGLP-1の分子型を調べた。彼等の研究により、GLP-1およびGLP-2は、夫々、37アミノ酸および34アミノ酸からなるペプチドとして膵臓に存在していることが示された。

GLP-1とグルカゴンとの類似性は、多くの初期の研究者に、GLP-1にも生物学的活性が存在し得るという示唆を与えていた。ある研究者達は、GLP-1がラット脳細胞のcAMP合成を誘発し得ることを見出した【フーサインら (Hoosain, N.M.) *Febs. Lett.* 178:83-86 (1984)】が、他の研究者達はGLP-1になんらの生理学的作用を同定することもできなかった (ロベツら)。GLP-1の生理学的作用の同定における失敗は、研究者達に、GLP-1が実際にホルモンであるか否か、およびグルカゴンとGLP-1との近縁関係は人為的なものではないかという疑問を抱かせた (ギグリオンら)。

結局、従来技術では、グルカゴンホルモンの前駆体がプロセッシングされて、広範囲にわたってホモロジーな1組のペプチドが生じることが認識されたことになる。当該技術分野における多くの人々が、これらの高度に関連しているグルカゴン様ペプチドには当然生物学的活性があると考えていた。にもかかわらず、これら分子の生物学的作用の解明を目指した多くの研究者が不成功に終わったのである。

#### 発明の要約

ホルモングルカゴンは、高分子量の前駆体として合成され、それがタンパク分解的に開裂されて3つのペプチド、グルカゴン、グルカゴン様ペプチド1 (GLP-1) およびグルカゴン様ペプチド2 (GLP-2) となることが知られている。GLP-1は、プロセッシングされない状態では37アミノ酸からなる。本発明は、未プロセッシングGLP-1が自然に、GLP-1の7-37アミノ酸を有す

る31アミノ酸長のペプチド (7-37ペプチド) に変換されることを開示するものである。このプロセッシングは、膵臓および腸管内で起こる。この7-37ペプチドはこれまで報告されたことのないインシュリン向性 (インシュリノトロピック) ホルモンである。このホルモンの作用は膵β細胞に特異的であり、該細胞のインシュリン合成を誘導すると思われる。プロセッシングされていないGLP-1は、本質的に、インシュリンの生合成の誘発を伝達することができない。このインシュリン向性ホルモンは、インシュリン分泌の動力が異常になっている、成年期発現性の糖尿病の病因研究に有用である。// 図面の簡単な説明

第1図は、ヒト、ラットおよびハムスターのプレログルカゴンのDNA構造および対応するアミノ酸配列を示す模式図である。プレログルカゴンは、丸で示した部位でタンパク分解的に開裂される。

第2図はラットの島細胞種の細胞内mRNAレベルに対するGLP-1ペプチドの影響を示す図である。

第3図はラット島細胞種の細胞内アンジオテンシンノーゲンmRNAレベルに対するGLP-1ペプチドの影響を示す図である。

第4図はラット島細胞種の細胞内アクチンmRNAレベルに対するGLP-1の影響を示す図である。

第5図は、GB4細胞内プロラクチンmRNAレベルに対するGLP-1 (1-37) の影響を示すX線図である。

第6図は、A1L-20細胞内ACTHmRNAレベルに対するGLP-1 (1-37) の影響を示す図である。

#### 好ましい実施態様

決定されたヒトGLP-1のアミノ酸配列から選択されたペプチド部分 (断片) は本発明を含む開発の出発物質である。GLP-1のアミノ酸配列は、数人の研究者によって報告されている【ロベツら (1983)、ベルら (Bel, G.I.) *Nature*, 302:716-718 (1983)、ハインリッヒら (1984)、ギグリオンら (1984)。】プレログルカゴン遺伝子の構造および対応するアミノ酸配列を第1図に示す。この図面は、前駆体遺伝子がタンパク分解的プロセッシングを受けてグルカゴンと2つのグルカゴン様ペプチドが産生される状態をも示すものである。本明細書中、GLP-1 (1-37) という表記は1 (N末端) から37 (C末端) までの全アミノ酸を含有するGLP-1ポリペプチドを指す。同様に、GLP-1 (7-37) は、7 (N末端) から37 (C末端) までの全アミノ酸を含有するGLP-1ポリペプチドを意味する。

1つの実施態様では、ペプチド断片は、メリフィールド (Merrifield, J.M.) [*Chem. Soc.*, 85:2149 (1962)] およびスチュワート (Stewart) およびヤング (Young) [*Solid Phase Peptide Synthesis*, (Freeman, San Francisco, 1969), 27-66頁] 記載の周知の固相ペプチド合成法で合成する。しかしながら、タンパク分解的な酵素を用い、天然に存在するアミノ酸を断片化してブ

ログルカゴンポリペプチドまたはGLP-1断片を得ることもできる。さらに、マニアティスら (Mannatis, T.) (Molecular Biology: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY 1982) の記載による組換えDNA技術を用いてプログルカゴンペプチドの所望の断片を得ることもできる。

本発明は、天然に存在するアミノ酸配列から誘導された、インシュリン向性のペプチド断片を提供するものである。

本発明は、式：

His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-  
Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-  
Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-  
Lys-Gly-Arg-Gly

で示される配列、または1またはそれ以上のアミノ酸が該配列に付加されるか該配列から欠失されてなる配列を有し、天然の不純物を実質的に含有せず、上記アミノ酸配列を有するペプチドと、実質上同様のインシュリン向性活性を有するペプチドまたはその化学的誘導体を提供するものである。なお、ここで、化学的誘導体とは、上記の式で示されるペプチドまたはそのアミノ酸の付加または欠失による誘導体の両末端のアミノ酸残基が化学的に修飾され、酸付加塩を形成しまたは保護されてなる誘導体である。特に興味深い化学的誘導体は、式：

$R^1N-X-CO-R^2$

【式中、 $R^1$ はOH、OMまたは $-NR^3R^4$ であって、ここにMは薬学的に許容し得る陽イオンまたは低級の分枝鎖または非分枝鎖アルキル基、 $R^3$ および $R^4$ は水素および低級の分枝鎖または非分枝鎖アルキル基からなる群から選択される互いに同一または異なる基であり、Xは上記のアミノ酸配列またはペプチドを表す）

で示されるペプチド誘導体、

(2) その酸付加塩、並びに

(3) 保護された、または部分的に保護された誘導体である。

本発明は、インシュリンの発現を促進する方法であって、哺乳類の膵B型島細胞に、有効量の上記インシュリン向性ペプチドを与えることからなる方法を提供するものである。

本発明範囲には、インシュリン向性ホルモンとして機能し得る上記ペプチド中のアミノ酸配列も含まれる。また、担体タンパク質、またはインシュリン向性効果を向上するために加えられるアミノ酸残基類との結合（カップリング）を促進するのに用いられる付加的なアミノ酸も包含される。ある物質は、正常な天然状態で該物質に随伴して見出される物質から精製されていれば、それは、「実質上、天然の不純物を含有しない」と言われる。GLP-1 (7-37) に伴う天然の不純物の例として、他のペプチド、炭水化物、グリコシル化されたペプチド、脂質および膜物質等がある。また、ある物質の試

料（サンプル）中にこれらの不純物が含有されていないときにも、その物質は、実質上、天然の不純物を含有しないと表される。

相互に交換可能な語句、「ペプチド断片」と「ペプチド部分」は、いずれも、天然に存在するアミノ酸配列から導かれる、合成および天然に存在するアミノ酸配列誘導体の両方を包含する意味で用いられる。

ペプチドは、それを天然に存在する配列を断片化して得ることができる場合、あるいは天然に存在するアミノ酸配列に関する知識、または該配列をコードしている遺伝物質（DNAまたはRNA）に関する知識に基いて合成し得る場合には、「天然に存在する配列から誘導された」と表現される。

さらに本発明は、選択された配列のもの以外に、天然に存在する配列中には含まれていない1またはそれ以上のアミノ酸が付加された、あるいは欠失されたポリペプチドであって、選択されたポリペプチドと同様の機能を有するポリペプチドにも関するものである。それら本発明のポリペプチドはGLP-1 (7-37) と実質上、同様のインシュリン向性活性を示すことを条件として、「機能的誘導体」と表現される。

「インシュリン向性活性（作用）」とは、ホルモンインシュリンの合成または発現を刺激する能力、あるいは、刺激を引き起こす能力に関連する語句である。

当業者ならば分かることであるが、アミノ酸残基は、適当なアミノ保護基またはカルボキシ保護基を用いて、保護された形または保護されていない形のいずれをもとり得る。有用な陽イオンは、アルカリ金属陽イオンまたはアルカリ土類基陽イオン（例えば、Na、K、Li、1/2Ca、1/2Ba等である）、またはアミノ陽イオン（例えば、アルキル基が $C_1-C_{12}$ の、テトラアルキルアンモニウム、トリアルキルアンモニウム等である）。

様々な長さのペプチドは、遊離アミノ形（N末端）またはその酸付加塩の形であってもよい。一般的な酸付加塩は、ハロゲン化水素の塩、即ち、HBr、HIより好ましくは、HClの塩である。

化合物のインシュリン向性は、該化合物を動物細胞に与えるか、動物に注射し、それぞれ、培地または動物の循環系への免疫反応性のインシュリン（IRI）の放出を監視することにより決定される。IRIの存在は、インシュリンを特異的に検出し得るラジオイムノアッセイを用いて検出することができ、IRIの存在を検出し得るラジオイムノアッセイであれば、どれを採用してもよいが、アルパノら (Albano, J.M.D.) [Acta Endocrinol. 70:487-509 (1972)] の分析法を改良した方法が好ましい。この改良法では、ホスフェート/アルブミン (pH 7.4) 緩衝液を用いる。りん酸緩衝液500ul、パーフセエート (perfusate) 試料液50ulまたはパーフセエート中ラットインシュリン標準液50ul、抗インシュリン抗血清100ul (Wellcome Laboratories, 1:40,000希釈)、および

[111] インシュリン100ulを、10×75mmの使い捨てガラス管内で全量750ulとし、連続的な条件下でインキュベーションを行った。4℃で2-3日間インキュベーションした後、炭素分離法によって、遊離のインシュリンを、抗体と結合したインシュリンから分離した。アッセイの感度は1-2uU/mlであった。組織培養中で培養した細胞の培地中に放出されたIRIを測定するために、放射活性に標識したプロインシュリンを導入することが好ましい。ポリペプチドをラベリング（標識すること）し得る放射活性標識ならば何でも使用可能である。Bロイシンを用いて標識化プロインシュリンを調製することが好ましい。ラベリングは、検出可能に標識されたプロインシュリン分子のプールを形成するのに充分な期間（時間）をかけて行えばよいが、放射活性標識の存在下、細胞を60分間インキュベートすることが好ましい。化合物が、インシュリン向性作用を有するか否かの決定には、インシュリンを発現し得る細胞ならば何でも利用できるが、ラットの島細胞腫細胞、および、特に、RI N-38ラット島細胞腫細胞を用いることが好ましい。そのような細胞は、適当なあらゆる培地で培養し得るが、0.1%BSAおよび25mMグルコースを含有するDMEM培地を用いることが好ましい。

化合物のインシュリン向性特性は、脾浸出によっても求められる。灌流したラット脾臓を自体そのままで単離して、改良ペンホス法 (Penhox, J.C.) [Diabetes, 18:733-738 (1969)] とした。絶食させた雄性チャールス・リバー種白子ラット（体重350-600g）を、アミタール・ナトリウム塩 (Amia Sodium, Eli Lilly and Co., 160mg/Kg) の腹腔内注射によって麻酔した。腎臓、副腎、胃、および下方結腸の血管を結紮した。十二指腸約4cm、下行結腸および直腸以外の全腸管を摘出した。従って、腸の小部分が灌流されたにすぎず、グルカゴン様免疫反応性を有する腸性物質による干渉を最小限に止めることができた。灌流は、4%デキストランT70および0.2%ウシ血清アルブミン（フラクションV）を含有する改良クレブス-リンゲル重炭酸塩緩衝液を用い、95%O<sub>2</sub>および5%CO<sub>2</sub>を吹き込んで行った。非バルス（搏動）性液流の4流路（チャンネル）ローラーベアリングポンプ [パッチェラー・ポリスタティック (Buchler Polystatic) Buchler Instruments Division, Nuclear-Chicago Corp.] を用い、一方の灌流源からもう一方への切り替えを3方向コック（蛇口）で行った。灌流の完了の様子を監視し、ワイヤーらの方法 (Weir, G.C.) [J. Clin. Invest., 54:1403-1412 (1974)] に従って解析した。

本発明の化合物は、既知の薬学的に有用な組成物調製法に従い、GLP-1 (7-37) またはその機能的な誘導体を薬学的に許容し得る担体賦形剤と混合して製剤化することができる。適当な賦形剤およびその製剤としては、他のヒトペプチド、例えば、ヒト血清アルブミン等

がレミントンの薬学 [Remington's Pharmaceutical Sciences (第16版オスロ (A. Oslo) 編, Mack, Easton PA (1980))] に記載されている。効果的な投与に適した薬学上許容し得る組成物が得られれば、そのような組成物は、GLP-1 (7-37) またはその機能的な誘導体を適量の担体賦形剤と一緒に含有しているであろう。

GLP-1 (7-37) またはその機能的な誘導体を含有する組成物は、静脈内、筋肉内、または皮下から、約1p g/kg (体重) ~1,000ug/kg (体重) の範囲の用量で投与されるが、それ以下またはそれ以上の用量を用いることもできる。必要とされる用量は、患者の症状の重症度、および患者の身長、体重、性、年齢、および病歴等の判断基準により左右される。

非経口投与のためには、GLP-1 (7-37) 含有組成物を蒸留水に溶かし、pH値を約6-8に調節する。凍結乾燥工程を促進して適当な生産物を得るためには、ラクトースを溶液に加えるとよい。次いで、得られた溶液を滅菌濾過し、バイアルに入れ、凍結乾燥する。これらの組成物中のGLP-1 (7-37) の濃度は10<sup>-11</sup> Mから10<sup>-6</sup> Mの間で変化し得る。

さらに他の薬学的手法を用いて作用の持続性をコントロールすることもできる。放出コントロール製剤は、GLP-1 (7-37) またはその機能的な誘導体とコンプレックスを形成するか、それを吸着するポリマーを用いて得ることができる。到達のコントロールは、放出をコントロールするための、適当な高分子（例えば、ポリエステル、ポリアミノ酸、ポリビニルピロリドン、エチレン酢酸ビニル、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、および硫酸プロタミン等）、高分子の濃度、および導入方法を選択することにより実行される。放出コントロール製剤によって作用の持続性をコントロールするための別法は、ポリエステル、ポリアミノ酸、ヒドロゲル、ポリ（乳酸）、またはエチレンと酢酸ビニルの共重合体等のポリマー原料の粒子にGLP-1 (7-37) を導入することからなる。別法として、これらのポリマー粒子にGLP-1 (7-37) を導入する代りに、例えば、夫々、ヒドロキシメチルセルロース、またはゼラチン-マイクロカプセルおよび（メチルメタクリレート）マイクロカプセル等の、コアセレーション技術または界面重合法によって調製されたマイクロカプセルにGLP-1 (7-37) を捕獲させるか、あるいは、リポソーム、アルブミン微粒子（マイクロスフェア）、マイクロエマルジョン、ナノ粒子、およびナノカプセル等のコロイド状薬物供給系（デリバリーシステム）、またはマイクロエマルジョン中に取り込ませることができる。そのような方法は、Remington's Pharmaceutical Sciences (1980) に記載されている。

#### 具体的実施例

##### 実施例1

移植可能なラットの島細胞腫 [ガザーら (Gazdar, A.

F.)、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 77:3519-3523 (1980) から樹立された連続的な島細胞系統(セルライン)、RIN-r から、細胞系統RIN-38、ラット島細胞腫細胞を得た。この細胞を、10%熱不活化ウシ胎児血清(Gibco)、ペニシリン100U/mlおよびストレプトマイシン100ug/mlを補充した、グルコース濃度4,500mg/LのDME M (Gibco) 中に維持した。空気95%、二酸化炭素5%中、37℃でインキュベーションを行った。上記の方法の下で増殖した細胞を洗浄し、0.1%ウシ血清アルブミンと25mMグルコースとを含有するDMEM (Gibco) に再懸濁した。様々な濃度のGLP-1 (1-37)、GLP-1 (7-37) またはGLP-1 (1-36des-gly-arg) と一緒に6時間インキュベートした後、これらの物質の内、どれがインシュリンmRNAの発現に影響を及ぼすかを決定した。以下のごとくにして、細胞性RNAをインシュリン特異的mRNAにつき、分析した。固形腫瘍および細胞をグアニジンチオシアネート中でホモジナイズし、塩化セシウムクッション中で沈降させることにより、細胞性RNAを抽出した。オリゴdTセルロース・クロマトグラフィーによってpoly A<sup>+</sup> RNAを単離した [アビブら (Aviv, E.) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 69:1408-1412 (1972)]。各試料から得た全RNA20ugを、グリオキサル中で変性した後、1.4%アガロースゲル電気泳動にかけてサイズ分画し、次いで、ナイロン・メンブラン (Nytran; Schleicher and Schull) に電気的に移した。プロットングした(はん点の付いた)メンブランを減圧下、80℃で2時間焼き、1M NaCl/1%SDS/10%硫酸デキストラン中、50℃で一晩、プレハイブリダイズした後、標識したプローブ(3-5×10<sup>5</sup>cpm/ml)を加え、同温で24時間ハイブリダイズさせた。次いで、1×SSC (0.15M NaCl/0.015Mクエン酸Na) /1%SDS) 中で55℃において2回洗浄し、-70℃において、様々な時間、強化スクリーンを用いてX線フィルムに露出させた。全てのケースでペプチド濃度は10<sup>-7</sup>Mであった。

この実験の結果を第2図に示す。レーン1-3(対照細胞)、4-6(GLP-1 (1-37))、7-9(GLP-1 (7-37))、10-12(GLP-1 (1-36des-gly arg-amide))は、産生されたインシュリン特異的mRNAの量を示している。各ペプチドについて、3回の繰り返し実験の結果が示されている。

マイクロデンシトメーターを用い、インシュリン特異的mRNAの相対量を求めた。この実験により、同一ペプチド濃度において、GLP-1 (7-37) は、対照(非処理)細胞より3倍以上高く、インシュリン遺伝子の発現を刺激することが分かった。

#### 実施例2

細胞系統RIN-38のラット島細胞腫細胞を実施例1記

載のごとく、DME培地中で培養した。10<sup>-7</sup>MのGLP-1 (1-37)、GLP-1 (7-37) およびGLP-1 (1-36) と一緒にインキュベートした後、細胞培養培地中のインシュリン濃度をラジオイムノアッセイ(既述)によって測定した。6時間インキュベートした後、インシュリンタンパク質濃度を測定した。実験結果を表1に示す。

表 1

加えられたペプチド	インシュリン生産量 (マイクロユニット/ml)
	なし
GLP-1(1-37)	2800
	5000

#### 実施例3

生存ラットの脾臓を、上記のごとく、様々な濃度のGLP-1 (1-37) およびGLP-1 (7-37) で灌流した。1分間隔で、ラジオイムノアッセイ(上記)によってラットの血清インシュリン濃度(ピコグラム/ml, pm/ml)を測定した。この実験の結果を表2に示す。灌流は、ペプチド濃度、5×10<sup>-7</sup>M、5×10<sup>-8</sup>M、5×10<sup>-9</sup>M、5×10<sup>-11</sup>M、および5×10<sup>-12</sup>Mで行った。0分の血清中濃度測定後、ペプチドを加えた。

GLP-1 (1-37) は、濃度5×10<sup>-7</sup>Mでラットの脾臓に灌流すると、血清中のインシュリン濃度の3.4倍増を伝達することが分かった。このペプチドは、濃度5×10<sup>-8</sup>Mでは、血清中インシュリン濃度の3倍増を伝達し得たにすぎない。また、濃度5×10<sup>-9</sup>Mでは、このペプチドは血清中インシュリン濃度を20%増加させただけである。

GLP-1 (7-37) は、濃度5×10<sup>-7</sup>Mでラットの脾臓に供給されると、血清中のインシュリン濃度の132倍増を刺激することが分かった。10倍低い濃度(5×10<sup>-8</sup>M)では、このペプチドは、インシュリンの血清中濃度の21倍増を命令することができるにすぎなかった。濃度10×10<sup>-9</sup>Mでは、GLP-1 (7-37) は、血清中インシュリン濃度の増加を伝達することができた(32倍)。5×10<sup>-11</sup>Mでも、GLP-1 (7-37) は、インシュリン濃度を15倍増加させることができたが、GLP-1 (1-37) は無効であった。

この実験は、GLP-1 (7-37) が、インシュリンのインビド発現の刺激作用に関してGLP-1 (1-37) の1,000倍以上の効力を有することを示している。しかも、これらの同じ実験において、GLP-1 ペプチドは、ペプチドホルモングルカゴンおよびソマトスタチンの放出に何の作用も示さなかった。このように、GLP-1 の刺激作用は、ベータ細胞に特異的であり、脾臓のアルファまたはデルタ細胞には作用しないといえる。

表 2  
ペプチド濃度に対するインシュリン生産(pcg/ml)

	時間(分)	$5 \times 10^{-12} M$	$5 \times 10^{-11} M$	$5 \times 10^{-10} M$	$5 \times 10^{-9} M$	$5 \times 10^{-8} M$
GLP-1(7-37)	0	50	975	205	160	50
	1	6600	20700	7400	2400	50
	2	4700	10500	1800	1700	50
	3	1700	4000	760	1900	98
	0	1400	3000	500	340	50
GLP-1(1-37)	1	4700	6000	600	180	50
	2	2900	2000	640	230	160
	3	2200	2000	430	340	50

## 実施例4

グルカゴン様タンパク質が細胞性cAMP濃度に影響を及ぼし得るか否かを調べるために、RINS-38島細胞腫細胞におけるcAMP濃度に対するGLP-1(7-37)およびGLP-1(1-37)の影響を調べた。実施例1記載のごとくにして26ウェルの培養皿中で細胞を培養した。培養ウェルに、種々の量のグルカゴン様ペプチドを加え、3回繰り返した。10分間インキュベーションを行った後、全細胞培地をcAMPについて検査し、cAMP濃度を測定した。この実験の結果を表3に示す。各培養液20ulを分析した。

表 3

ペプチド濃度(M)	産生されたcAMPのピコモル	
	実験 I	実験 II
0	140	91
$10^{-8}$	400	170
$10^{-7}$	370	120
$10^{-6}$	494	160
$10^{-5}$	515	100
$10^{-4}$	253	90
$10^{-3}$	533	90

この実験により、GLP-1(7-37)は、濃度 $10^{-11} M$ で存在する場合にも、cAMP濃度を刺激することが分かった。cAMP濃度の増加はGLP-1(7-37)が細胞リセプターと相互作用し得ることを示唆するものである。

## 実施例5

GLP-1(1-37)、GLP-1(1-36)およびGLP-1(7-37)の作用がインシュリンに特異的であり、非特異的な遺伝子発現を誘導または刺激することがないことを証明するために、これらのペプチドの、アクチンおよびアンギオテンシノーゲンのmRNAの濃度に対する影響を調べた。実施例1に記載のごとくにしてRINS-38島細胞腫細胞を培養し、GLP-1(1-37)、GLP-1(7-37)、またはGLP-1(1-36) des-Gly arg (Peninsula Laboratories)の存在下にインキュベートした。ペプチド濃度は全て $10^{-7} M$ であった。インキュベーション時間は6時間であった。インシュリン、アクチンまたはアンギオテンシノーゲンに特異的なmRNAを実施例1記

載のごとく、ノーザンハイブリダイゼーションによって同定した。この実験の結果を表2図(インシュリンmRNA)、第3図(アンギオテンシノーゲンmRNA)および第4図(アクチンmRNA)に示す。第2、3および4図のRNAゲルの走査(スキヤニング)フィルムから得た代表的な濃度計単位でmRNA濃度を決定した。mRNA濃度を表4に示す。

表 4

RINS-38島細胞腫細胞における、インシュリン、アクチンおよびアンギオテンシノーゲンをコードするmRNAの細胞内濃度に対するグルカゴン様ペプチドの影響

ペプチド*	mRNA		
	インシュリン	アクチン	アンギオテンシノーゲン
GLP-1(7-37)	$4.23 \pm 0.74$	$0.82 \pm 0.08$	$2.78 \pm 0.46$
GLP-1(1-37)	$1.87 \pm 0.56$	$0.91 \pm 0.02$	$2.25 \pm 0.20$
GLP-1(1-36) des-Gly	$2.78 \pm 0.80$	$0.88 \pm 0.03$	$2.56 \pm 0.22$
アルギニンアミド対照 (非ペプチド)	$1.28 \pm 0.23$	$0.89 \pm 0.05$	$2.67 \pm 0.31$

## 実施例6

GLP-1(1-37)が、インシュリン以外のホルモンの生合成を誘導するか否かを決定するために実験した。即ち、GLP-1(1-37)(濃度 $10^{-7} M$ )をラットのグルカゴン産生性の島細胞系統および、夫々、ホルモンであるプロラクチンおよびACTHを産生する2つの脳下垂体細胞系統(GH4およびAtT-20)に加え、実施例1記載のごとく、24時間後に産生されたホルモン特異的なmRNAの量を測定した。GLP-1ペプチドと一緒にインキュベーションした後の、GH4脳下垂体細胞内のプロラクチンmRNA濃度を第5図に示す。また、GLP-1ペプチドと一緒にインキュベーションした後の、AtT-20脳下垂体細胞内



のACTB mRNA濃度を第6図に示す。これらの実験の結果、GLP-1 (1-37) は、これらのペプチドホルモンをコードしているmRNAの量になんらの検出可能な影響を及ぼさないことが分かった。

#### 実施例7

GLP-1 (7-37) のRINS-38島細胞腫細胞におけるインシュリン遺伝子およびアクチン遺伝子の転写に及ぼす影響を調べた。遺伝子の転写速度は、対照およびTPA処理細胞由来の核内での発生のグルカゴンおよびベータ-アクチンのRNA転写物を定量することによって決定された。核性RNAを、ニトロセルロースに結合させた、過剰量のクローニングした特異的DNAとハイブリザイズさせ、フィルターを洗浄した [マックナイトら (McKnight, C.S.), J. Biol. Chem. 254:9050-9058 (1979)]。ラットグルカゴン [ハインリッヒら (Heinrich, G.), Endocrinology, 115:1-6 (1984)] および、対照として、ニワトリのベータ-アクチンcDNA [クリーブランド博士 (Dr. D. Cleveland), ジョーンズホプキンス大学医学部、ボルチモア、メアリーランドから提供されたもの] を用いた。ハイブリザイゼーション効率を、 $[^3\text{H}]$  UTP グルカゴンcDNAのハイブリザイゼーション溶液を加えることによってコントロールした。実験を2回行い、結果をcDNA挿入体のppm/kbとして表し、ハイブリザイゼー

ン効率について補正した (40-50%)。細胞を、濃度  $10^{-11}$  MのGLP-1 (7-37) と一緒に4時間インキュベートした。0、1、および4時間目に核を細胞から調製し、発生のインシュリン遺伝子転写物およびアクチン遺伝子転写物の分析におけるニュークレアーラン (nuclease) により評価した (McKnight, C.S. ら)。この実験の結果を表5に示す。実験結果から、GLP-1 (7-37) が、インシュリン遺伝子の転写率を増大させるが、アクチン遺伝子の発現率には検出可能な効果を示さないことが分った。

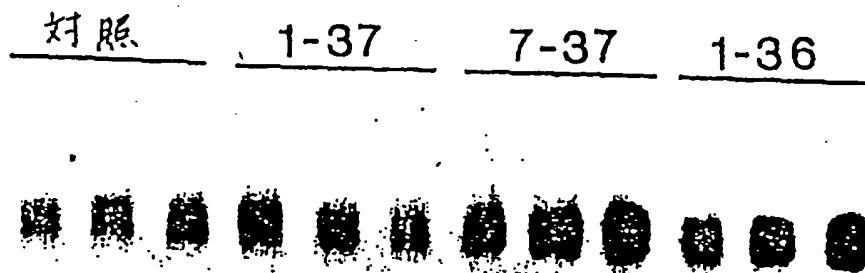
表5

グルカゴン様ペプチド I (7-37) の、RINS-38島細胞腫細胞中でのインシュリンおよびアクチン遺伝子の転写に及ぼす影響

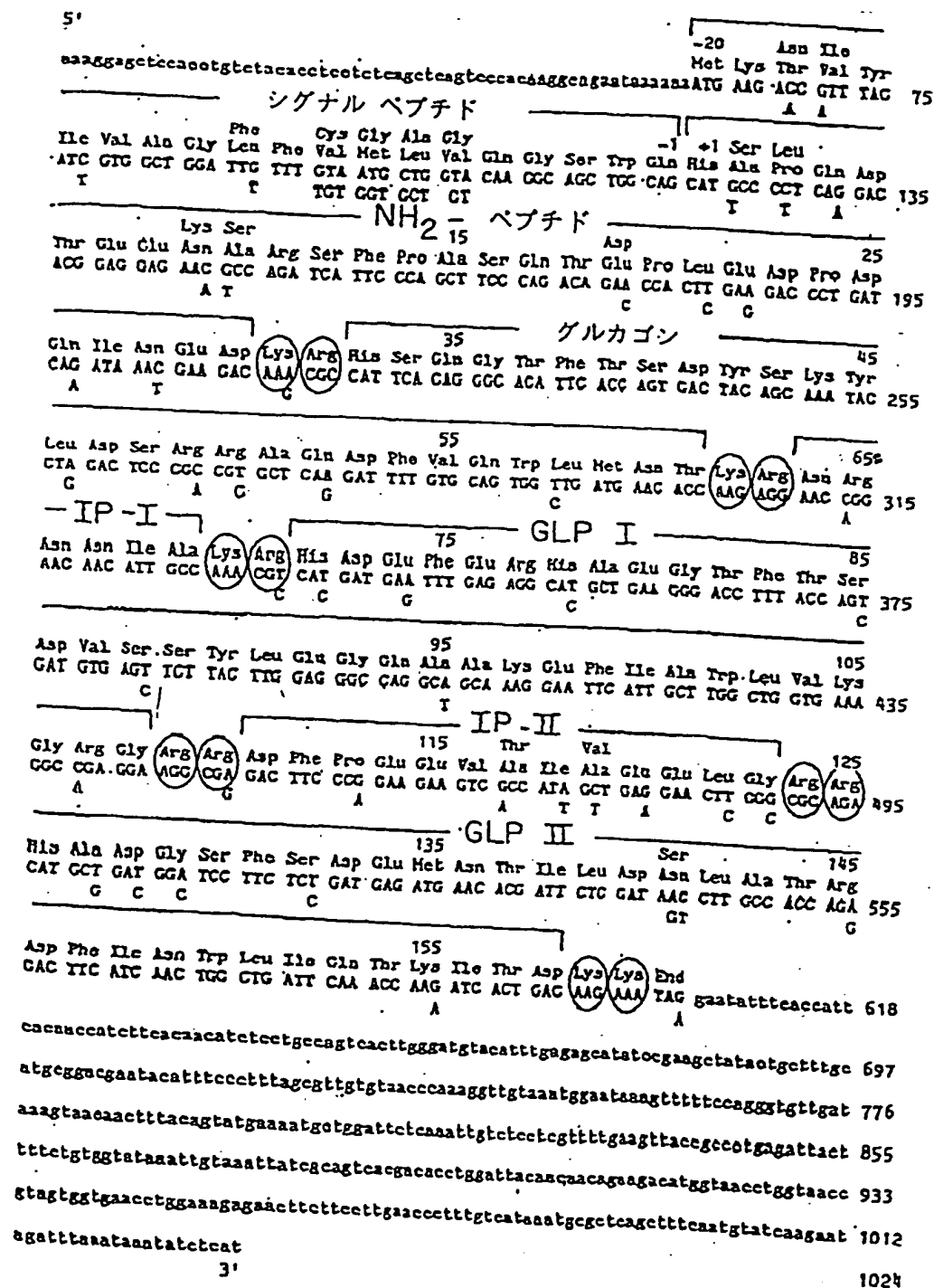
時間 (時間)	インシュリン遺伝子	アクチン遺伝子
0	17.4	34.1
1	76.2	29.9
4	9.0	25.0

本明細書には本発明の全容が記載されているので、当該技術分野における通常の技術者が僅かな修飾を施して同様のことを行うことができ、それらも本発明の技術思想に包含されることは明らかである。

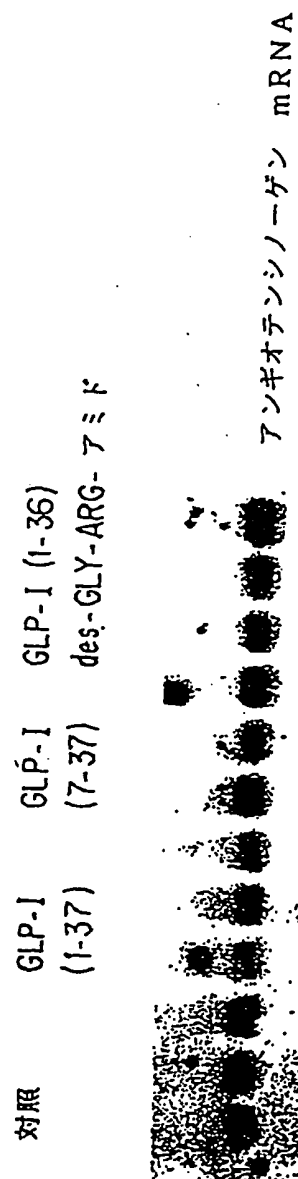
【第2図】



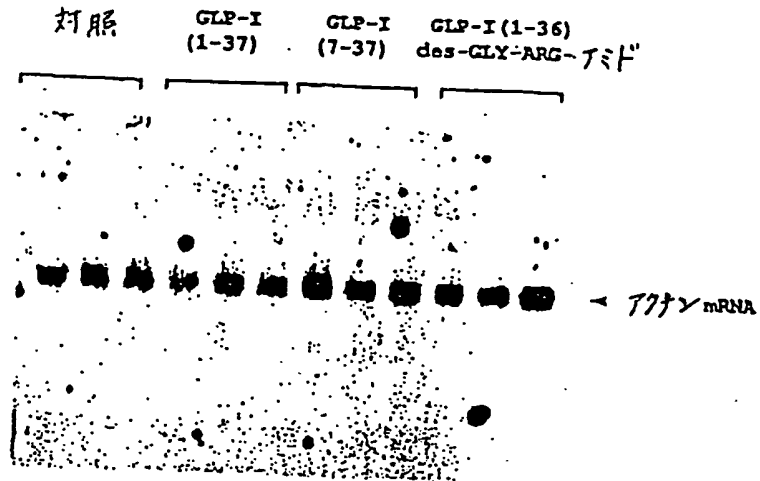
[第1図]



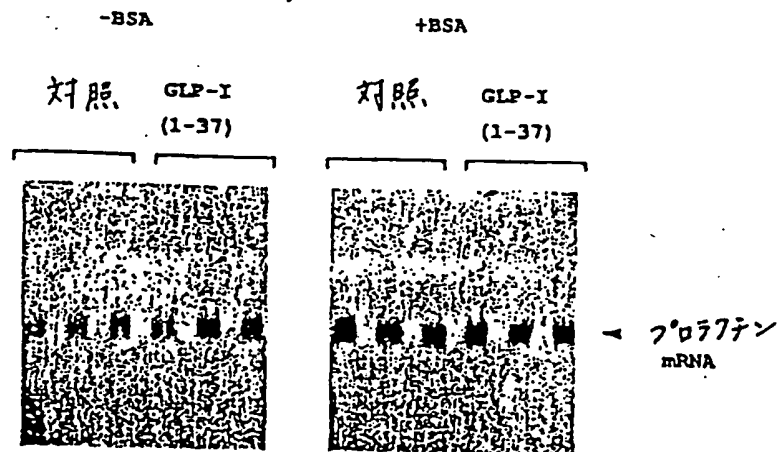
【第3図】



【第4図】



【第5図】



(12)

特許2583257

〔第6図〕

